

RÉGI MAGYAR ALMA TÁJFAJTÁK GENETIKAI ELKÜLÖNÍTÉSE SSR PRIMEREK SEGÍTSÉGÉVEL

WICHMANN BARNABÁS¹, GALLI ZSOLT¹,
KISS ERZSÉBET¹, SZABÓ TIBOR², HESZKY LÁSZLÓ¹

¹Szent István Egyetem (SZIE), Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő 2103

wwbarna@yahoo.com

²Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht, Újfehértó 4244

ABSTRACT: Altogether 40, mainly old Hungarian apple varieties were screened with six previously described microsatellite markers. A total of 71 polymorphic alleles were detected (average 11,8 alleles/locus) and the heterozygosity of markers averaged very high (0,8). The genetic variability among the genotypes proved to be such remarkable that as few as three markers from the applied six were enough to distinguish the 40 varieties. This was confirmed also by the cumulative probability of obtaining an identical allele patterns for two randomly chosen apple genotypes for all locus, which value was so low: $2,53 \times 10^{-5}$. The molecular identification of these genetically very different old genotypes could be very useful in future breeding programs.

Kulcsszavak: mikroszatellita markerezés, genetikai variabilitás, optimális primer kombináció

Key words: microsatellite fingerprinting, genetic variability, optimal primer combination

BEVEZETÉS

A globalizáció következtében a genetikai diverzitás fokozatos csökkenése figyelhető meg. A nagyjából 10000 éve kezdődött és ma is tartó „nemesítési” folyamat eredményeképpen, a mai ember ételkészítésének 90%-át, 15 növény valamint 8 állatfaj biztosítja. A gyümölcsstermesztésben belül, az alma termesztésben csak néhány nemzetközi fajta vesz részt annak ellenére, hogy csak Európában, több mint ezer almafajta található. A köztermesztésben lévő fő fajták a *Golden Delicious*, *Red Delicious* valamint a *Granny Smith* és a *Gala*. Ezek a fajták a termesztés több mint 70%-át fedik le, tehát a maradék fajták részvétele még a 30%-ot sem éri el.

Az almanemesítés fő célja a gyümölcsök méretének, színének, ízének módosítása, melyekkel a mindenkori fogyasztó igényeinek kíván megfelelni. Mindezek mellett rezisztens/toleráns fajták előállítása is folyamatban van, pl. üszög (*Podosphaera leucotricha*), alma varasodás (*Venturia inaequalis*) valamint a bakteriális tűzelhalás (*Erwinia amylovora*) ellen. Ezekhez szükséges genetikai háttér megtalálható a vad fajtákban és tájfajtákban is. A termesztett fajták, régi fajtákkal való keresztezése igen időigényes folyamat. Fennáll annak a lehetősége, hogy bizonyos, nem kívánatos tulajdonságok is öröklődnek vagy olyan már meglevő tulajdonságok tűnnek el, melyek a szülői vonalakban korábban már jelen voltak. Kedvezőtlen jellegek eltávolítása miatt hosszantartó keresztezésekre és visszakeresztezésekre is szükség lehet, mire újból rögzíthetjük a kívánt jellegeket. Számos tájfajta napjainkra már csak néhány kertben található. Betegség rezisztencia géneket hordozhatnak, valamint adaptálódtak a Kárpát-medence klímájához és szélsőséges időjárási viszonyához, ezáltal értékes nemesítési alapanyagot képviselhetnek.

Az elkülönítésükre a mikroszatellit (SSR: simple sequence repeats) markerek bizonyultak a legalkalmasabbaknak, mert jó polimorfizmust adó, ismétlődő elemeket tartalmaznak, valamint öröklődésük kodomináns. Korábban más genetikai markerezési technikákat, mint pl. RAPD (MULCAHY *et al.* 1993) vagy ISSR (GOULÃO és OLIVEIRA, 2001) is bevontak a

fajok és fajták elkülönítésére. A retrotranszpozonok hosszú, ismétlődő végeire is terveztek primereket, melyekkel korábban már sikerült különböző fajtákat elkülöníteni (ANTONIUS-KLEMOLA *et al.* 2006). Jelenleg több mint 200 SSR marker fejlesztése fejeződött be (GUILFORD *et al.* 1997, GIANFRANCESCHIE *et al.* 1998, HOKANSON *et al.* 1998, LIEBHARD *et al.* 2002). Ezek a markerek már bizonyítottan elegendő információt szolgáltatnak és sikeresen alkalmazhatók az elkülönítéses vizsgálatokban vad illetve termesztésbe vont alma fajok esetében (GOULÃO & OLIVEIRA 2001, HOKANSON *et al.* 2001, LIEBHARD *et al.* 2002, LAURENS *et al.* 2004). Az SSR primerek alkalmazásával különbséget lehet tenni fajták között, emellett az utódok megkülönböztethetők a szülő genotípusoktól.

A munkánk fő célja régi magyar tájfajták és kereskedelmi fajták közötti különbség meghatározása volt SSR primerek segítségével. Céljaink között szerepelt továbbá, hogy a lehető leggazdaságosabb, valamint legegyszerűbb technikát dolgozzunk ki és alkalmazzunk a vizsgált genotípusok molekuláris elkülönítésére.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A 40 magyar tájfajta (3. táblázat) fiatal leveleit, – DNS tartalmuk feltárásához – az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht-ben gyűjtöttük. Korábbi kísérletek eredményei alapján kiválasztott 6 SSR primert alkalmaztuk a tájfajták allél méreteinek meghatározásához (GALLI *et al.* 2005).

A genomiális DNS-kivonására DNeasy® Plant Mini Kit-et (Qiagen) használtunk. A PCR amplifikációt Cy-5-tel jelölt SSR primerekkel végeztük, Perkin Elmer 9700 készüléken. Az alkalmazott hat oligonukleotid primert (CH03g07, CH04e03, CH04g10, CH05c02, CH05d11, CH05e03) korábban már azonosították (LIEBHARD *et al.* 2002). A reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük, melyet az alábbi komponensek alkottak: 50 ng templát DNS, 1 × PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH: 8,3, 1.1 mM MgCl₂, 0,01% zselatin), hozzáadva még 0,9 mM MgCl₂, 0,3 µM-t mindkét primerből, 0,2 mM mindegyik dNTP-ből és 1,2 U Red-Taq DNS polimeráz (Sigma). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os denaturációt követően 20 másodperces 94°C, 30 másodperces 56°C és 1 perc 72°C 35 ismétlésben. Az amplifikációs folyamatot 5 perces 72°C-os ciklussal zártuk le. Az amplifikáció hatékonyságát 1.2%-os agaróz gélen ellenőriztük. A mikroszatellit allélokat ALFexpress-II DNS analizáló készülékkel (Amersham BioSciences) különítettük el. A szeparációhoz 50-500bp nagyságú ALFexpress™ sizer™-t használtunk, mint külső standardot. A vizsgálatokat kétszeres technikai és biológiai ismétlés mellett végeztük.

A vizsgált mikroszatellit allélok gyakorisága alapján meghatároztuk az egyes allélok, Polymorphic Information Content (PIC) értékét (heterozigotizációs index) az alábbi formula segítségével: $PIC = 1 - \sum p_i^2$ ahol ' p_i ' az i -edik allél gyakoriságát jelöli (ANDERSON *et al.* 1993). A fajták azonosításhoz minimálisan szükséges markerek számának és kombinációjának meghatározásához, összesen 40 különböző tájfajta (N=40) genetikai ujjlenyomatát készítettük el. A megegyezőségi valószínűséget (probability of identity - PI) a megfigyelt SSR primerek esetében, két találmásra választott almafajta esetében a következő

képlet alapján számoltuk: $PI = \prod_{j=1}^j C_j$ (TESSIER *et al.* 1999).

A cluster analízishez a detektált alléleket külön-külön binárisan kódoltuk, a fragmentumok megléte (1), illetve hiánya (0) alapján. A molekuláris dendrogram elkészítéséhez a Jaccard indexet alkalmaztuk, az SPSS 11.0 (Windows) statisztikai szoftver csomag felhasználásával.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

SSR primer párok segítségével megbízható alléleket szaporítottunk fel a 40 magyar tájfajta esetében. Összesen 71 polimorf allélt kaptunk a 6 markerrel. CH03g07 primer esetén kaptuk a legalacsonyabb értéket, ahol összesen 8 allél, míg a legmagasabb értéket CH05e03 primer esetében kaptuk, 15 allél szaporodott fel. Átlagban primerenként 11.8 allélt kaptunk (1. Táblázat). A megismételt reakciók is megerősítették az eredményeket.

1. Táblázat: A kísérletekben használt 6 SSR primer fontosabb adatai (PIC: Polymorphism Information Content, C: Confusion probabilities, LIEBHARD *et al.* 2002).

2.

SSR	forward primer szekvencia reverse primer szekvencia 5' → 3'	Allél méret	Allél szám	PIC	Allél méret	Allél szám	PIC	C
		Liebhard <i>et al.</i> 2002			Saját eredmények			
CH03g07	aat aag cat tca aag caa tcc g ttt ttc caa atc gag ttt cgt t	119-181	5	0.77	119-179	8	0.75	0.233
CH04e03	ttg aag atg ttt ggc tgt gc tgc atg tct gtc tcc tcc at	179-222	11	0.88	161-222	13	0.81	0.166
CH04g10	caa aga tgt ggt gtg aag agg a gga ggc aaa aag agt gaa cct	127-168	5	0.83	123-168	11	0.79	0.192
CH05c02	tta aac tgt cac caa atc cac a gcg aag ctt tag aga gac atc c	168-200	4	0.60	160-200	12	0.77	0.214
CH05d11	cac aac ctg ata tcc ggg ac gag aag gtc gta cat tcc tca a	171-211	5	0.69	169-227	12	0.86	0.113
CH05e03	cga ata ttt tca ctc tga ctg gg caa gtt gtt gta ctg ctc cga c	158-190	10	0.87	149-193	15	0.84	0.128

Számos új korábban még nem publikált allél méretet kaptunk a tájfajták esetében. (LIEBHARD *et al.* 2002) Ez magyarázhatja a PIC értékek különbözőségét is.

Ezeket az eredményeket korábbi kísérleteinkkel is összehasonlítottuk (GALLI *et al.* 2005), melyekben 66 kereskedelmi almafajtát vizsgáltunk. A korábbi kísérletekben a PIC értékek igen magasak voltak, különösen a CH04g10, CH05d11 markerek esetében, ahol az értékek emelkedése 30%-os volt. Azon primerek, melyek nem voltak alkalmasak a kereskedelmi fajták elkülönítésére, meglepően használhatóaknak bizonyultak a tájfajták elkülönítése során. Ez is azt a feltételezést támasztja alá, hogy a variabilitás igen jelentős a tájfajták között.

Az allélek magasabb száma általában magasabb PIC értékeket is eredményezett, bár nem minden esetben, hiszen az allélek százalékos megoszlása is fontos szerepet játszik e vonatkozásban (2. Táblázat). Primerek közül a CH05d11 marker szolgáltatta a legjobb elkülönítési lehetőséget a maga 12 alléljával, jobbat, mint a CH05e03 marker a 15 alléllal. Mindegyik SSR marker rendelkezett legalább egy vagy kettő olyan allél mérettel melyek gyakran jelentek meg a fajtákban. Ezekkel a primerekkel akár a fajták közötti különbség is jellemezhető volt, de a biztosabb elkülönítés miatt mind a 6 SSR primert felhasználtuk.

Az átlagos heterozigotitás mértéke 76%-os, mely a 41% és 83% között változott. Ezek az értékek megerősítik a korábban leírt eredményeket (GIANFRANCESCHI *et al.* 1998, HOKANSON *et al.* 1998, LIEBHARD *et al.* 2002 és LAURENS *et al.* 2004). A CHO4g10 primer alkalmazása eredményezte a legtöbb homozigóta allélt (47%).

2. Táblázat: A 6 SSR primer esetében kapott allél méretek (bp) és százalékos megoszlásuk (%) a 40 vizsgált magyar tájfajta esetében.

CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
Size %	Size %	Size %	Size %	Size %	Size %
119 31.5	161 1.4	123 9.0	160 11.7	169 10.3	149 1.4
121 1.4	176 1.4	125 1.5	164 1.3	171 16.7	155 1.4
123 9.6	184 6.8	127 7.5	168 40.3	173 23.1	157 1.4
127 11.0	186 4.1	135 38.8	170 11.7	175 14.1	161 5.4
129 35.6	192 1.4	137 17.9	172 19.5	177 6.4	163 27.0
153 4.1	196 37.8	139 1.5	174 1.3	181 3.8	165 2.7
165 5.5	198 10.8	141 3.0	176 6.5	187 11.5	167 4.1
179 1.4	200 2.7	143 9.0	180 1.3	195 3.8	171 2.7
	202 5.4	147 1.5	190 1.3	203 1.3	173 20.3
	204 9.5	155 3.0	196 1.3	205 5.1	175 1.4
	208 6.8	168 7.5	198 1.3	225 2.6	179 4.1
	210 4.1		200 2.6	227 1.3	183 1.4
	222 8.1				185 5.4
					191 18.9
					193 2.7

Az almafajták elkülönítése a hat mikroszatellitával egyenletes eloszlást mutatott. Amennyiben az allélt csak egyszer találtuk meg a fajtában, homozigóta duplikátumnak vettük. Ezeknél a fajtáknál annak eldöntésére, hogy valóban homozigóta diploidok vagy null alléles heterozigóták szegregációs vizsgálatokra van szükség. (A specifikus allélek intenzitása rendszerint segít ebben a gyakorlatban. Az valódi homozigóta allélek csúcsai magasabb értékűek).

Amennyiben három allél volt megkülönböztethető abból triploidiára következtettünk. Összesen 15 fajta esetében határoztunk meg triploidiát. A harmadik allél nem műtermék, amit bizonyít, hogy az ismétlésekben is hasonló eredményeket kaptunk. Sajnálatos módon a tájfajták pedigreje ismeretlen. Feltételezhető, hogy a múltban triploid formákat is bevontak a nemesítésbe, valószínűleg a jobb gyümölcs karakterisztikájuk miatt.

3. Táblázat: A 40 alma tájfajta 6 SSR primer által kapott allélméretei bázispárban (bp).

Tájfajták	CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
Alant alma	119,129	196,204	125,135	172,200	175,177	165,165
Amália	119,129	184,200	123,143,155	160,168	171,177	163,173
Asztraháni fehér	129,165	196,198	135,141	170,176	173,175	163,173
Asztraháni piros	129,129	198,204	135,135	170,176	173,175	191,191
Burgundi	123,129	186,196	135,135	168,168	171,173	165,191
Bogovits alma	123,127	184,202	135,135	168,196	171,171	170,170
Dániel-féle renet	119,119	196,204	135,168	168,172	169,175	163,163
Chieftain	129,153	196,196	135,168	168,200	171,173	163,191
Nyári csíkos						
fűszeres	119,129	161,161	135,147	160,170	169,187,195	163,191
Éva	119,129	196,204	135,135	168,176	173,173	185,191
Fekete tányér						
alma	119,129	196,202	135,135	168,172	195,225	173,191
Fertődi téli	119,123,129	184,196	135,135	168,168	173,173	163,168
Húsvéti						
rozmaring	119,129	192,196,202	135,135	168,172	173,187,205	191,191
Gravensteini	123,129	196,208	135,137	168,172,176	169,187	163,193
Jakab alma	119,119	186,208	135,135	168,170	173,205	163,173
Kenézi piros	123,129	196,204	137,141	168,172	173,186	163,173
Keszthelyi kúpos						
alma	119,119	196,208	135,135	168,172	173,175	173,191
Középfajta renet	119,129	186,196	123,143,155	160,168,172	173,177	155,167,183
Kubany	123,127	184,198	127,135	168,172	171,171	173,185
Liptói-féle						
rozmaring	119,127	196,198	127,137	170,176	177,181	163,167,179
Mutsu II.	119,127	198,222	127,135	168,174	171,173	163,179,185
Nyári fontos	119,129	196,222	137,137	160,168,172	171,181,187	161,173
Nyári sóvári	119,129	176,196	127,139	168,172	169,225	163,173
Őszi borízú	127,127	196,196	135,135	160,168	169,195	157,191
Őszi piros renet	129,129	196,208	123,137,143	160,170	173,173	163,163
Puha sóvári	119,129	196,210	137,137	170,170	169,205	163,173
Rózsa alma	119,129	210,222	135,168	168,168	173,186	173,191
Sárga édes	121,127	202,222	137,137	168,172	171,187	149,173
Sikulai	129,165	196,210	137,137	168,190	175,177	163,193
Simonffy piros	119,129	196,200	123,135,143	170,170	173,227	160,173
Széchenyi renet	129,153,165	196,222	123,137,143	168,198	171,175	171,179
Téli arany						
parmen	129,153	196,196	135,135	168,170	169,175	163,163
Téli banán	119,127	184,196	127,137	164,168	169,205	163,185
Téli fehér kálvil	119,129	198,208	135,168	168,168	171,173	163,191
Téli fehér tafota	127,127	196,196	135,135	168,172	173,175	163,163
Tordai piros						
kálvil	119,129	196,204	137,168	168,168	171,175,187	173,191
Újvári őszi alma	119,129	196,222	135,135	160,168,172	171,181,187	160,173
Vajalma	123,179	196,196	137,137	160,168	173,203	161,191
Világ dicsősége	119,119	198,204	135,135	172,180	171,171	191,191
Vista Bella	165,165	198,198	123,135,143	160,168	175,175	163,173

Az alma genotípusok sikeres elkülönítése már három SSR marker (CH05d11, CH05e03, CH04e03) esetében is sikeres volt (4. Táblázat). A két legpolimorfabb SSR marker (CH05d11, CH05e03) használata esetén összesen csak 2 genotípus pár ('Dániel-féle renet' – 'Téli arany parmen' és 'Chieftain' – 'Téli fehér kálvil') nem volt elkülöníthető egymástól, azonban a harmadik primer (CH04e03) bevonásával ez az elkülönítés is lehetővé vált.

4. Táblázat: A leghatékonyabb SSR markerekkel végzett elkülönítési vizsgálatok. A számok a nem elkülöníthető fajtaikat számszerűsítik a megfigyelt és a számított értékek alapján.

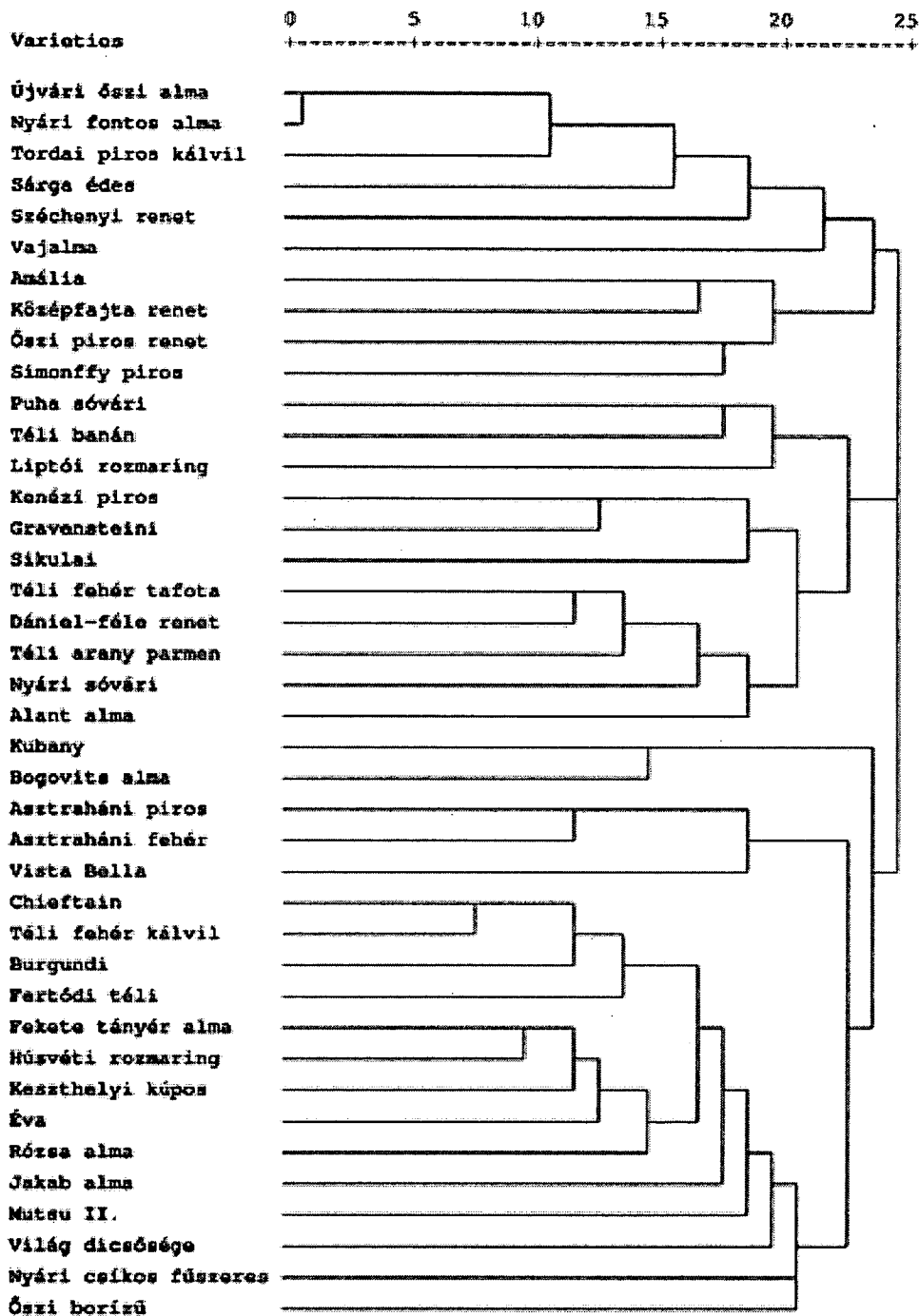
Marker Kombináció	Elkülöníthetetlen párok	
	Valós	Számított
CH05d11	46	88.3
CH05d11 + CH05e03	4	12.4
CH05d11 + CH05e03 + CH04e03	0	2.1
CH05d11 + CH05e03 + CH04e03 + CH04g10	0	0.4

Annak a valószínűsége, hogy két különböző fajta ugyanazokkal az allélekkel legyen jellemezhető az összes vizsgált lókuszt esetén (Probability of Identity), alacsony ($2,53 \times 10^5$ mely aránypárba rendezve: 1:39525). Ez a tény megerősíti az SSR markerek alkalmazásának helyességét az alma fajtaik esetében, valamint azt a tényt, hogy ezek között a tájfajták között igen nagy a genetikai variabilitás. Korábbi munkánkban (GALLI *et al.* 2005) ez az érték jóval alacsonyabb volt ($1,79 \times 10^4$).

Egyezőségi mátrixokat számoltunk az SSR adatokból. Az UPGMA alapú dendrogram adatait az 1. ábra mutatja. Bebizonyosodott, hogy, minél több SSR markert alkalmazunk annál pontosabb eredményt kapunk. Ezen okokból használtuk fel mind a 6 SSR markert a 40 tájfajta elkülönítéséhez. Ez megfelelő felbontást biztosított a dendrogramnak a fajtaik elkülönítéséhez.

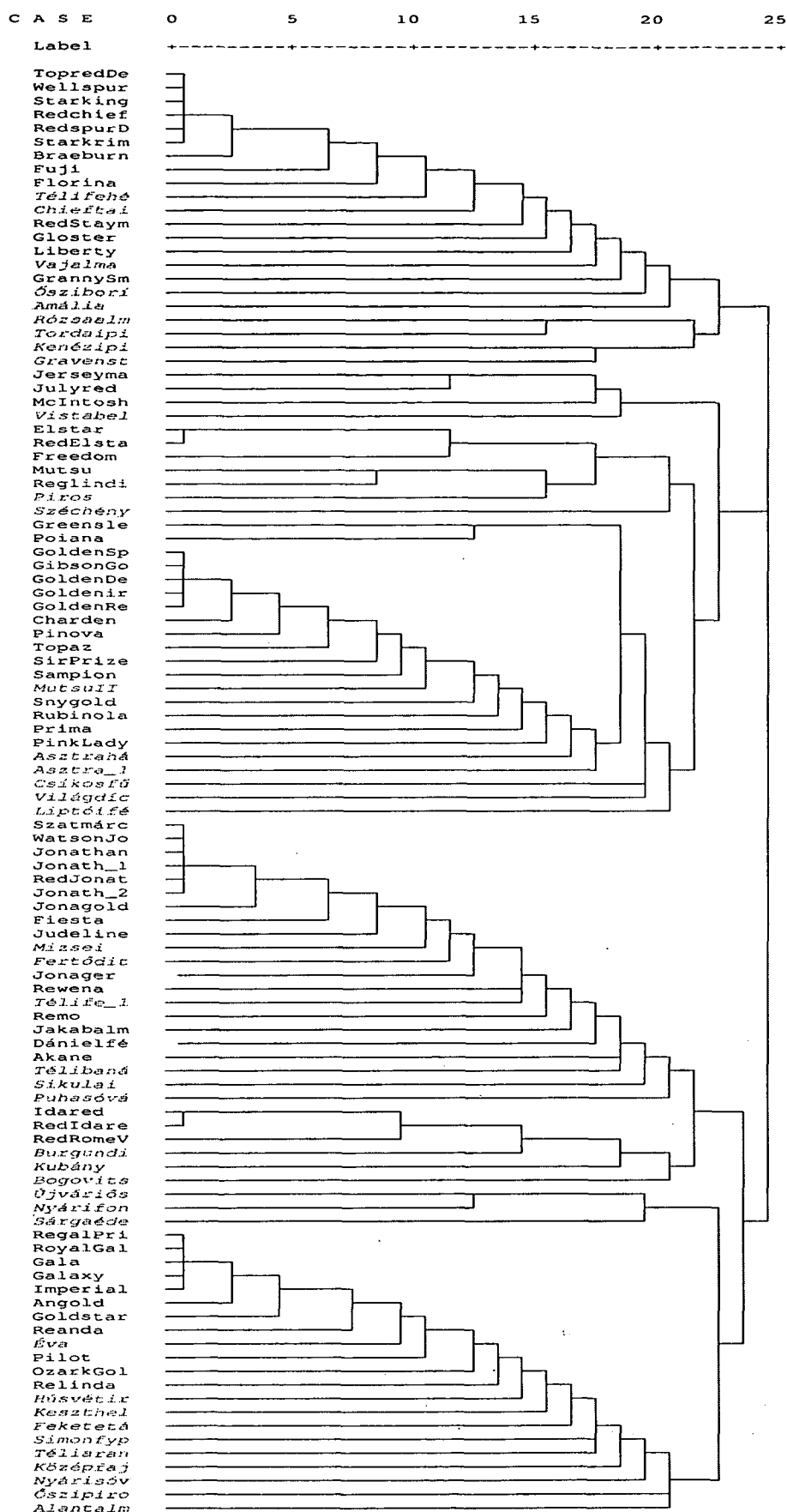
A legközelebbi kapcsolatot (több mint 73% egyezés) az 'Újvári őszi alma' és a 'Nyári fontos alma' mutatja. Számos genotípus pár mutat teljes különbözőséget, tehát ezek elkülönítése is igen egyszerűen megoldható a vizsgált primerekkel ('Világ dicsősége' – 'Őszi piros renet', 'Bogovits alma' – 'Puha sóvári', 'Asztraháni piros' – 'Sárga édes'). Az 'Asztraháni piros' és 'Asztraháni fehér' fajtaik – melyeket könnyen akár rügymutáns fajtaiknak is gondolhatnánk – csupán 50%-os hasonlóságot mutatnak csak, mely alapján a szomatikus mutáció teljességgel elképzelhetetlen.

A nagy genetikai variancia érték megerősíti a génbanki célú gyűjtések nemesítési jelentőségét. SSR markerek fejlesztése ezekre a genotípusokra, olyan – nemesítést is támogató – módszer, mely lehetővé teszi az új, betegségeknek ellenállóbb, jobb gyümölcs minőségű alma fajtaik előállítását.



1. Ábra: 40 magyar tájfajta dendogramja 6 SSR primer felhasználásával.

Korábbi munkánk eredményét is felhasználva (GALLI *et al.*, 2005) a dendogramra alapozott összehasonlítást elvégeztük mind a 66 kereskedelmi és mind a 40 tájfajta esetében. A 2. ábra szerint nincs leszármazási különbség a két csoportban, mert mind a tájfajták, mind a kereskedelmi fajták nagy homológiát mutatnak. A legtöbb tájfajta a *Gala* alma csoporttal mutat homológiát ($13/40 = 32,5\%$).



2. ábra: 66 kereskedelmi (GALLI *et al.* 2005) és 40 magyar tájfajta összehasonlító dendrogramja. A könnyebb elkülönítés érdekében a magyar tájfajtákat dőlt betűvel írtuk.

IRODALOMJEGYZÉK

- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D. & Sorrels, M.E. (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Antonius-Klemola, K., Kalendar, R. & Schulman, A. H. (2006): TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theor. Appl. Genet.* 112:999-1008.
- Galli, Z., Halász, G., Kiss, E., Heszky, L. & Dobránszki, J. (2005): Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *HortScience* 40(7):1974-1977.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. & Gessler, C. (1998): Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96:1069-1076.
- Goulão, L. & Oliveira, C. M. (2001): Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122:81-89.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H. & Forster, R. (1997): Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism, and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94:249-254.
- Hokanson, S. C., Szewc-McFadden, A. K., Lamboy, W. F. & McFerson, J. R. (1998): Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity, and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97:671-683.
- Hokanson, S.C., Lamboy, W. F., Szewc-McFadden, A. K. & McFerson, J. R. (2001): Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118:281-294.
- Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.
- Laurens, F., Durel, C. E. & Lascostes, M. (2004): Molecular characterization of French local apple cultivars using SSRs. *Acta Hort.* 663:639-642.
- Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C. D., Tarchini, R., Van De Weg, E. & Gessler, C. (2002): Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10:217-241.
- Mulcahy, D.L., Cresti, M., Sansavini, S., Douglas, G. C., Linskens, H. F., Bergamini Mulcahy, G., Vignani, R. & Pancaldi, M. (1993): The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae*, 54(2):89-96
- Tessier, C., J. David, P., This, J., Boursiquot, M. & Charrier, A. (1999): Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98:171-177.